

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-139480

(43)Date of publication of application : 23.05.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
 A01K 67/027  
 A61K 38/43  
 A61K 39/395  
 A61K 45/00  
 A61K 48/00  
 A61P 1/16  
 A61P 9/10  
 A61P 13/12  
 A61P 19/04  
 A61P 19/10  
 A61P 29/00  
 A61P 43/00  
 C07K 16/18  
 C12N 5/10  
 C12N 9/14  
 C12P 21/02  
 C12Q 1/34  
 C12Q 1/68  
 G01N 33/15  
 G01N 33/50  
 G01N 33/53  
 // C12P 21/08  
 (C12N 9/14  
 C12R 1:91 )

(21)Application number : 11-248436

(71)Applicant : TAKEDA CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 02.09.1999

(72)Inventor : YOSHIMURA KOJI  
 HIKICHI YUICHI  
 NISHIMURA ATSUSHI

(30)Priority

Priority number : 10250115    Priority date : 03.09.1998    Priority country : JP

## (54) NEW PROTEIN AND ITS DNA

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new protein which is composed of ADAM protein containing a specific amino acid sequence, participates in cell differentiation, biophylaxis or the like and is useful as a treating and preventing agent for disk hernia, ischialgia, glomerular nephritis, hepatic fibrosis, osteopetrosis or the like.

**SOLUTION:** This protein is new ADAM protein (salt) containing an amino acid sequence homologous or substantially homologous to the amino acid sequence represented by the formula, participates in the physiological function, e.g. cell fusion, cell differentiation, biophylaxis or the like, and is useful as a treating and

Leu Glu Thr Asp His Leu Ser Tyr Phe His Cys Gly Val Arg Leu Leu Val  
 1 5 10 15  
 Glu Met Gly Gln Asp Cys Asp Cys Gly Thr Ser Glu Gly Cys Thr Asp  
 20 25 30  
 His Cys Cys Asp Arg Lys Thr Cys Lys His Lys Ala Thr Phe Gln Cys  
 35 40 45  
 Ala Leu Gly Gln Cys Cys Glu Lys Cys Glu Phe Lys Lys Ala Gly Met  
 50 55 60  
 Val Cys Arg Phe Ala Lys Asp Glu Cys Asp Leu Phe Gly Met Cys Asp  
 65 70 75 80  
 Gly Cys Ser Gly Asn Cys Phe Asp Asp Arg Phe Glu Val Asn Phe Phe  
 85 90 95

preventing agent or the like for various diseases, e.g. intervertebral disk hernia, sciatica glomerular nephritis, diabetic nephropathy, hepatic fibrosis, fibroid lung and osteopetrosis. This new protein is obtained by preparing a library by the use of a genome DNA or cDNA arising from the cell and tissue of human beings or warm-blooded animals, cloning it by means of PCR method by the use of a synthetic DNA primer containing the partial base sequence of this protein and integrating the resultant gene into expression vector to express in a host cell.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-139480

(P2000-139480A)

(43) 公開日 平成12年5月23日 (2000.5.23)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	
A 6 1 K 38/43		A 6 1 K 39/395	D
39/395			N
		45/00	
審査請求 未請求 請求項の数36 O L (全 48 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平11-248436	(71) 出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22) 出願日	平成11年9月2日 (1999.9.2)	(72) 発明者	吉村 浩二 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田 春日ハイツ101号
(31) 優先権主張番号	特願平10-250115	(72) 発明者	引地 裕一 茨城県つくば市松代四丁目21番2 シャレ ールつくば松代1号棟504
(32) 優先日	平成10年9月3日 (1998.9.3)	(72) 発明者	西村 篤 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田 春日ハイツ104号
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	100114041 弁理士 高橋 秀一 (外2名)

(54) 【発明の名称】 新規タンパク質およびそのDNA

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 新規ADAMタンパク質の提供。

【解決手段】 ADAMファミリーに属する新規タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該タンパク質をコードするDNA、該DNAを含有する組換えベクター、形質転換体、該タンパク質の製造法、該タンパク質もしくはDNA含有してなる医薬、該タンパク質に対する抗体、該タンパク質のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法/スクリーニング用キット。

【効果】 本発明のタンパク質またはそれをコードするDNAは、例えば、椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症もしくは大理石病などの種々の疾病の治療・予防剤として使用することができる。また、本発明の抗体は、被検液中の本発明のタンパク質の定量などに使用することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩。

【請求項 2】配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列をディスプレイ領域として有する請求項 1 記載のタンパク質又はその塩。

【請求項 3】ADAMファミリーに属する請求項 1 記載のタンパク質またはその塩。

【請求項 4】配列番号：1 または配列番号：15 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する請求項 1 記載のタンパク質またはその塩。

【請求項 5】プロテアーゼ活性を有する請求項 1 記載のタンパク質またはその塩。

【請求項 6】配列番号：6 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する請求項 1 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項 7】配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する DNA を有する DNA。

【請求項 8】配列番号：3 または配列番号：16 で表される塩基配列を有する請求項 7 記載の DNA。

【請求項 9】請求項 6 記載の部分ペプチドをコードする DNA を有する DNA。

【請求項 10】配列番号：4 で表される塩基配列を有する請求項 9 記載の DNA。

【請求項 11】請求項 7 記載の DNA を有する組換えベクター。

【請求項 12】請求項 11 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 13】請求項 12 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 記載のタンパク質を生成せしめることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質またはその塩の製造法。

【請求項 14】請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

【請求項 15】請求項 7 記載の DNA または請求項 14 記載の抗体を含有してなる診断薬。

【請求項 16】請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる剤。

【請求項 17】請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 18】椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病の予防・治療剤である請求項 17 記載の医薬。

【請求項 19】請求項 1 記載のタンパク質またはその塩

を用いることを特徴とする、プロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 20】請求項 1 記載のタンパク質またはその塩を含有してなる、プロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 21】請求項 19 記載のスクリーニング方法または請求項 20 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、プロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

【請求項 22】請求項 19 記載のスクリーニング方法または請求項 20 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 23】配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩を含有してなる細胞外マトリックス分解剤。

【請求項 24】細胞外マトリックスがプロテオグリカンである請求項 23 記載の剤。

【請求項 25】医薬組成物である請求項 23 記載の剤。

【請求項 26】椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症もしくは大理石病の予防・治療剤である請求項 23 記載の剤。

【請求項 27】配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩を用いることを特徴とする、細胞外マトリックス分解酵素活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 28】配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩を含有してなる、細胞外マトリックス分解酵素活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 29】請求項 27 記載のスクリーニング方法または請求項 28 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、細胞外マトリックス分解酵素活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

【請求項 30】請求項 27 記載のスクリーニング方法または請求項 28 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、細胞外マトリックス分解酵素活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 31】配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩に対する抗体を含有してなる診断薬。

【請求項 32】被検遺伝子を導入した組換え体と動物由来の軟骨あるいは軟骨基質産生細胞を混合培養し、培養上清中の硫酸化グリコサミノグリカンを測定することを特徴とするプロテオグリカン分解酵素遺伝子を検出する

方法。

【請求項 33】 (1) プロテオグリカン分解酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入した組換え体、(2) 動物由来の軟骨または軟骨基質産生細胞および(3) 被検物を混合培養し、培養上清中の硫酸化グリコサミノグリカン量を測定することを特徴とする、プロテオグリカン分解酵素の活性阻害剤あるいは活性促進剤のスクリーニング方法。

【請求項 34】 (1) ①請求項 7 記載の DNA または ②配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする塩基配列を有する DNA を含有する動物細胞、(2) 動物由来の軟骨または軟骨基質産生細胞および(3) 被検物を混合培養し、上清中の硫酸化グリコサミノグリカン量を測定することを特徴とするプロテオグリカン分解酵素の活性阻害剤あるいは活性促進剤のスクリーニング方法。

【請求項 35】 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する DNA を有する DNA またはその変異 DNA を有する非ヒト哺乳動物。

【請求項 36】 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質を発現する請求項 35 記載の動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な ADAM タンパク質に関する。

【0002】

【従来の技術】細胞外マトリックスは、組織の細胞を取り巻く細胞支持組織であり、コラーゲンやエラスチンなどの繊維性タンパク質、プロテオグリカンなどの複合糖質、細胞接着などに関係のあるフィブロネクチン、ラミニンなどの糖タンパク質及びヒアルロン酸などの糖質からなる。細胞外マトリックスは細胞の形態・代謝・移動・増殖・分化など細胞の活動に重大な影響を与えることが知られている。したがって、生体の発生・加齢・炎症・創傷治癒・免疫・腫瘍など多くの生体現象と関連することが知られている。また、慢性関節リウマチ、変形性関節症、骨粗鬆症、ガンの転移・浸潤、動脈硬化、角膜潰瘍など種々の疾病においては細胞外マトリックスの異常な分解が起こることも知られている。この細胞外マトリックスの分解に関与する酵素の作用を調節することにより、これらの疾患の治療薬となる可能性がある。

【0003】ADAM (A disintegrin and metalloprotease) ファミリータンパク質は、出血性蛇毒に類似した構造を持ち、メタロプロテアーゼ領域及びディスインテグリン領域等からなる。ADAM ファミリータンパク質の多くは膜タンパク質であり、種々の生物から 10 個以上の cDNA が単離されている (T. G. Wolfsberg et al., Journal

of Cell Biology 131:275-278, 1995)。ADAM タンパク質の生理的機能としては細胞融合、細胞分化、生体防御等に関与することが知られている。すなわち、精子上で発現する ADAM である fertilin はディスインテグリン領域を介して卵子上のインテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  と結合し、卵子と精子の結合に関与する (D. Myles et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4195-4198, 1994)。meltrin のディスインテグリン領域は筋細胞の融合に関与することが報告されている (T. Yagami-Hiromasa et al., Nature 377:652-656, 1995)。また、ショウジョウバエの ADAM タンパク質である KUZ は神経分化に関与する (J. Rooke et al., Science 273:1227-1230, 1996)。また、TNF- $\alpha$  convertase (R. A. Black et al., Nature 385:729-733, 1997) や ADAM10 (C. A. Lunn et al., FEBS letter 400:333-335, 1997) では膜に結合した TNF- $\alpha$  前駆体を切断し分泌型に変換することが報告されている。

【0004】

【本発明が解決しようとする課題】新たなヒト由来 ADAM ファミリータンパク質は、その活性を調節する作用を有し、その活性に基づく種々の疾患、例えば慢性関節リウマチや変形性関節症などの関節疾患の予防や治療に役立つ新たな医薬品の開発を可能にする。したがって、本発明の分野ではヒト由来の新規な ADAM タンパク質を見出し、大量に生産する方法の開発が望まれていた。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、新規な塩基配列を有する ADAM 遺伝子を見出し、それにコードされる ADAM タンパク質がプロテアーゼ活性を有し、さらに細胞外マトリックスの分解にも関与することを見出した。本発明者は、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は、(1) 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩、(2) 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列をディスインテグリン領域として有する前記 (1) 記載のタンパク質又はその塩、

(3) ADAM ファミリーに属する前記 (1) 記載のタンパク質またはその塩、(4) 配列番号：1 または配列番号：15 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する前記 (1) 記載のタンパク質またはその塩、(5) プロテアーゼ活性を有する前記 (1) 記載のタンパク質またはその塩、(6) 配列番号：6 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する前記 (1) 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、(7) 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する DNA を有する DNA、(8) 配列番号：3 ま

たは配列番号：16で表される塩基配列を有する前記(7)記載のDNA、(9)前記(6)記載の部分ペプチドをコードするDNAを有するDNA、(10)配列番号：4で表される塩基配列を有する前記(9)記載のDNA、(11)前記(7)記載のDNAを有する組換えベクター、(12)前記(11)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、(13)前記(12)記載の形質転換体を培養し、前記(1)記載のタンパク質を生成せしめることを特徴とする前記(1)記載のタンパク質またはその塩の製造法、(14)前記(1)記載のタンパク質もしくは前記(6)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、(15)前記(7)記載のDNAまたは前記(14)記載の抗体を含有してなる診断薬、(16)前記(1)記載のタンパク質もしくは前記(6)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる剤、(17)前記(1)記載のタンパク質もしくは前記(6)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、(18)椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病の予防・治療剤である前記(17)記載の医薬、

【0007】(19)前記(1)記載のタンパク質またはその塩を用いることを特徴とする、プロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(20)前記(1)記載のタンパク質またはその塩を含有してなる、プロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(21)前記(19)記載のスクリーニング方法または前記(20)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、プロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩、(22)前記(19)記載のスクリーニング方法または前記(20)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、(23)配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩を含有してなる細胞外マトリックス分解剤、(24)細胞外マトリックスがプロテオグリカンである前記(23)記載の剤、(25)医薬組成物である前記(23)記載の剤、(26)椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症もしくは大理石病の予防・治療剤である前記(23)記載の剤、(27)配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩を用いることを特徴とする、細胞外マトリックス分解酵素活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(28)配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩を含有してなる、細胞外マトリックス分解酵素活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリー

ーニング用キット、(29)前記(27)記載のスクリーニング方法または前記(28)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、細胞外マトリックス分解酵素活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

(30)前記(27)記載のスクリーニング方法または前記(28)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、細胞外マトリックス分解酵素活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(31)配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩に対する抗体を含有してなる診断薬、(32)被検遺伝子を導入した組換え体と動物由来の軟骨あるいは軟骨基質産生細胞を混合培養し、培養上清中の硫酸化グリコサミノグリカン測定すること、(33)(i)プロテオグリカン分解酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入した組換え体、(ii)動物由来の軟骨または軟骨基質産生細胞および(iii)被検物を混合培養し、培養上清中の硫酸化グリコサミノグリカン測定すること、(34)(i)①前記7記載のDNAまたは②配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、を含有する動物細胞、(ii)動物由来の軟骨または軟骨基質産生細胞および(iii)被検物を混合培養し、上清中の硫酸化グリコサミノグリカン量を測定すること、(35)配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを有するDNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、(36)配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質を発現しうる前記(35)記載の動物などを提供する。

【0008】さらには、本発明は、(37)配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と約95%以上、好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列である前記(1)記載のタンパク質、(38)配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、①配列番号：2で表されるアミノ酸配列中の1～5個(好ましくは、1～3個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：2で表されるアミノ酸配列に1～5(好ましくは、1～3個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：2で表されるアミノ酸配列中の1～5個以上(好ましくは、1～3個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、ま

たは④それらを組み合わせたアミノ酸配列である前記  
(1) 記載のタンパク質、(39) 前記(7) または  
(9) 記載のDNAをコードする塩基配列とハイストリン  
ジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有す  
るDNAを含有するDNA、(40) 前記(39) 記載  
のDNAを含有する組換えベクター、(41) 前記(4  
0) 記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換  
体、(42) 前記(41) 記載の形質転換体を培養し、  
前記(39) 項記載のDNAにコードされるタンパク質  
を生成し、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とす  
る前記(39) 記載のDNAでコードされるタンパク質  
またはその塩の製造法、(43) 前記(42) 記載の製  
造法で製造される、前記(39) 記載のDNAでコード  
されるタンパク質またはその塩、

【0009】(44) (i) 前記(1) 記載のタンパク  
質、前記(6) 項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩  
に基質を接触させた場合と、(ii) 前記(1) 記載のタ  
ンパク質、前記(6) 記載の部分ペプチドまたはそれら  
の塩に基質および試験化合物を接触させた場合におけ  
る、プロテアーゼ活性を測定し、比較することを特徴と  
する前記(19) 項記載のスクリーニング方法、(4  
5) 前記(19) 項記載のスクリーニング方法または前  
記(20) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得  
られる、前記(1) 記載のタンパク質、前記(6) 項記  
載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性  
を促進する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(46) 椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖  
尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病の治療  
・予防剤である前記(45) 記載の医薬、(47) 前記

(19) 記載のスクリーニング方法または前記(20)  
記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、前記

(1) 記載のタンパク質、前記(6) 記載の部分ペプ  
チドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を阻害する化  
合物またはその塩を含有してなる医薬、(48) 慢性関節  
リウマチ、変形性関節症、骨粗鬆症、癌、動脈硬化、角  
膜潰瘍の治療・予防剤である前記(47) 記載の医薬、

【0010】(49) 前記(14) 記載の抗体と、被検  
液および標識化された前記(1) 記載のタンパク質、前  
記(4) 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩とを競合  
的に反応させ、該抗体に結合した標識化された前記

(1) 記載のタンパク質、前記(4) 記載の部分ペプ  
チドまたはそれらの塩の割合を測定することを特徴とする  
被検液中の前記(1) 記載のタンパク質、前記(6) 項  
記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法、(5  
0) 被検液と担体上に不溶化した前記(14) 項記載の  
抗体および標識化された前記(14) 記載の抗体とを同  
時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標  
識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の前記

(1) 記載のタンパク質、前記(6) 項記載の部分ペ  
プチドまたはそれらの塩の定量法、(51) 前記(14)

項記載の抗体を含有してなる医薬、(52) 前記

(7)、(9) または(39) 記載のDNAに相補的ま  
たは実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現  
を抑制し得る作用を有するアンチセンスDNA、(5  
3) 前記(7)、(9) または(39) 項記載のDNA  
に実質的に相補的な塩基配列が、該DNAに相補的な塩  
基配列の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約95%以  
上、好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列  
である前記(52) 記載のアンチセンスDNA、(5  
4) 前記(52) 記載のアンチセンスDNAを含有して  
なる医薬、(55) 配列番号：5で表されるアミノ酸配  
列と同一もしくは実質的にアミノ酸配列を含有するタン  
パク質またはその塩に対する抗体と被検液および標識化  
された配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もし  
くは実質的にアミノ酸配列を含有するタンパク質または  
その塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化  
された配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もし  
くは実質的にアミノ酸配列を含有するタンパク質または  
その塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の配  
列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質  
的にアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩の  
定量法、(56) 被検液と担体上に不溶化した配列番  
号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に  
アミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩に対  
する抗体および標識化された配列番号：5で表されるアミ  
ノ酸配列と同一もしくは実質的にアミノ酸配列を含有す  
るタンパク質またはその塩に対する抗体とを同時ある  
いは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の  
活性を測定することを特徴とする被検液中の配列番号：  
5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的にアミ  
ノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩の定量法、  
(57) 配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一も  
しくは実質的にアミノ酸配列を含有するタンパク質ま  
たはその塩に対する抗体を含有してなる医薬などを提供す  
る。

#### 【0011】

【発明の実施の形態】本発明の配列番号：1、配列番  
号：2、配列番号：5または配列番号：15で表わされ  
るアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸  
配列を有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質と  
称する）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラ  
ット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウ  
シ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経  
細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングイ  
ム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内  
皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免  
疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュ  
ラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸  
球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨  
芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞

胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など) もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞(例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など)に由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

【0012】配列番号: 1、配列番号: 2、配列番号: 5または配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、それぞれ配列番号: 1、配列番号: 2、配列番号: 5または配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列と約95%以上、好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。特に、配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列の第428~437番目のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列、配列番号: 2で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号: 2で表わされるアミノ酸配列の第29~38番目のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列、配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列の第428~437番目のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列などが挙げられる。本発明の配列番号: 1、配列番号: 2、配列番号: 5または配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号: 1、配列番号: 2、配列番号: 5または配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。本明細書中、プロテアーゼ様活性とは、例えばペプチド結合を切断(加水分解)する活性などを意味する。本発明中、細胞外マトリックス分解酵素活性とは、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン、ヒアルロン酸などからなる組織の細胞を取り巻く細胞支持組織を分解する酵素活性、特にプロテオグリカンを分解する

酵素活性(プロテオグリカン分解酵素活性)などを意味する。実質的に同質の活性としては、例えば、プロテアーゼ活性、細胞外マトリックス分解酵素活性(好ましくはプロテオグリカン分解酵素活性)などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に(例、生理化学的に、または薬理学的に)同質であることを示す。したがって、プロテアーゼ活性、細胞外マトリックス分解酵素活性(好ましくはプロテオグリカン分解酵素活性)などの活性が同等(例、約0.1~100倍、好ましくは約0.5~10倍、より好ましくは0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。プロテアーゼ活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。プロテオグリカン分解酵素活性を指標とした細胞外マトリックス分解酵素活性の測定は、例えば後述の実施例6記載の方法に従って測定することができる。

【0013】また、本発明のタンパク質としては、例えば、①配列番号: 1、配列番号: 2、配列番号: 5または配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列中の1~5(好ましくは、1~3個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号: 1、配列番号: 2、配列番号: 5または配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列に1~5(好ましくは、1~3個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号: 1、配列番号: 2、配列番号: 5または配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列に1~5個(好ましくは、1~3個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号: 1、配列番号: 2、配列番号: 5または配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列中の1~5個(好ましくは、1~3個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。また、挿入、欠失または置換の位置としては、配列番号: 1または配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列のうち、第119番目のVal~495番目のPhe以外の位置または第336番目のThr~350番目のAsp以外の位置などがあげられる。

【0014】配列番号: 2で表わされるアミノ酸配列は、配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列の第400番目(Leu)~第495番目(Phe)のアミノ酸配列に相当し、配列番号: 5で表わされるアミノ酸配列は、配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列の第199番目(Val)~第399番目(Pro)のアミノ酸配列に相当する。

【0015】本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端



がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1、配列番号：2、配列番号：5または配列番号：15で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピルもしくは $n$ -ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{5-6}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるビバロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明のタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイルなどの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1または配列番号：15で表わされるアミノ酸配列を有するヒト由来のタンパク質（図1および図2または図3および図4）などが用いられる。

【0016】本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明のタンパク質と同様の活性（例、プロテアーゼ活性、細胞外マトリックス分解酵素活性（好ましくはプロテオグリカン分解酵素活性））を有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列中の少なくとも20%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは70%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上のアミノ酸配列を有し、プロテアーゼ活性、細胞外マトリックス分解酵素活性（好ましくはプロテオグリカン分解酵素活性）を有するペプチドなどが用いられる。これらペプチドの中でも、例えば、配列番

号：1で表わされるアミノ酸配列の第28～37番目のアミノ酸配列（配列番号：8で表わされるアミノ酸配列）を有するアミノ酸配列を含有するペプチドなどが用いられる。また、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列および配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドなども好適である。また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは、1～3個のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1～5個（好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1～5個（好ましくは、1～3個のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは、1～3個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されている）もよい。

【0017】また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のタンパク質と同様に、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原として用いることができるので、必ずしもプロテアーゼ活性、細胞外マトリックス分解酵素活性（好ましくはプロテオグリカン分解酵素活性）を有する必要はない。

【0018】本発明のタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のタンパク質またはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後述するタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせてることにより精製分離することができる。

【0019】本発明のタンパク質、部分ペプチド、もしくはそれらの塩、またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-

(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそれらのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOObt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0020】保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用することが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N'-ジメチルホルムアミド、N,N'-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃~50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセ

チルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

【0021】原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化(例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級(C<sub>1-6</sub>)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl2-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0022】原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル[アルコール(例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt)とのエステル]などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなど

による塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $40^{\circ}\text{C}$ の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0023】原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

【0024】本発明の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, NewYork (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株)(1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドまたはシグナルペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0025】本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotalRNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：3で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：3で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、プロテアーゼ活性、細胞外マトリックス分解酵素活性（好ましくはプロテオグリカン分解酵素活性）など）を有するタンパク質をコードするDNA、②配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、プロテアーゼ活性、細胞外マトリックス分解酵素活性（好ましくはプロテオグリカン分解酵素活性）など）を有するタンパク質をコードするDNA、③配列番号：16で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：16で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、プロテアーゼ活性、細胞外マトリックス分解酵素活性（好ましくはプロテオグリカン分解酵素活性）など）を有する

タンパク質をコードするDNA、であれば何れのものでよい。

【0026】配列番号：3、配列番号：4または配列番号：16のいずれかの配列番号で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、それぞれ配列番号：3、配列番号：4または配列番号：16のいずれかの配列番号で表わされる塩基配列と約95%以上、好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAなどが、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNAなどが、配列番号：15で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：16で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

【0027】本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：3で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNA、②配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明の実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNA、③配列番号：16で表わ

される塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：16で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明の実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。配列番号：3、配列番号：4または配列番号：16のいずれかの配列番号で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

【0028】本発明のタンパク質または部分ペプチド(以下、これらタンパク質等をコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらタンパク質等を単に本発明のタンパク質と略記する)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutantTM-G (宝酒造 (株))、MutantTM-K (宝酒造 (株)) などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0029】ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバ

クテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMV

(サイトメガロウイルス)プロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘ

ドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0030】発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0031】宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞な

どが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)〕, JM103〔ヌクレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)〕, JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)〕, 120巻, 517(1978)〕, HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)〕, C600〔ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)〕などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114〔ジーン, 24巻, 255(1983)〕, 207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)〕などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71などが用いられる。

【0032】昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)〕。動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr<sup>-</sup>)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞、ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことが

できる。

【0033】バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0034】エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L.

ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞膜に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【0035】上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精

製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0036】かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成する本発明のタンパク質またはその塩の存在または活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0037】本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、抗体の説明においては、これらタンパク質等を単に本発明のタンパク質と略記する）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

#### 【モノクローナル抗体の作製】

##### （a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モ

ノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature）、256、495（1975）〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

【0038】骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/O、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20％、好ましくは10～20％の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10％の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5％炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

##### 【0039】（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アル



コール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法）に従って行うことができる。

【0040】〔ポリクローナル抗体の作製〕本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリア蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリア蛋白質との複合体に関し、キャリア蛋白質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0041】本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、アンチセンスDNAの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約7

0%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

【0042】以下に、本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のタンパク質等と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、およびアンチセンスDNAの用途を説明する。

【0043】（1）本発明のタンパク質が関与する各種疾病の治療・予防剤

本発明のタンパク質は細胞外マトリックスの分解（特にプロテオグリカンの分解）に寄与しているので、本発明のタンパク質をコードするDNAに異常があったり、欠損している場合、例えば、椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病などの種々の疾病が発症する可能性が高い。したがって、本発明のタンパク質等および本発明のDNAは、例えば、椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病などの種々の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。例えば、生体内において本発明のタンパク質が減少あるいは欠損している患者がいる場合に、（イ）本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質等を発現させることによって、

（ロ）細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のタンパク質等を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のタンパク質等を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質等の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。本発明のタンパク質等を上記の治療・予防剤



として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

【0044】本発明のタンパク質等は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80<sup>TM</sup>、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

【0045】このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例え

ば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。本発明のタンパク質等の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、糖尿病性腎症の治療目的で本発明のタンパク質等を経口投与する場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき該タンパク質等を約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質等の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、糖尿病性腎症の治療目的で本発明のタンパク質等を注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質等を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

#### 【0046】（2）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質等はプロテアーゼ活性及び／または細胞外マトリックス（特にプロテオグリカン）分解酵素活性を有するため、本発明のタンパク質等の機能（例、プロテアーゼ活性、細胞外マトリックス分解酵素活性

（好ましくはプロテオグリカン分解酵素活性）などを促進する化合物またはその塩は、椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病など疾病の治療・予防剤などの医薬として使用できる。一方、本発明のタンパク質等の機能を阻害する化合物またはその塩は、慢性関節リウマチ、変形性関節症、骨粗鬆症、動脈硬化、角膜潰瘍（好ましくはプロテオグリカン分解酵素活性）などの治療・予防剤などの医薬として使用できる。したがって、本発明のタンパク質等は、本発明のタンパク質等の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。すなわち、本発明は、

①本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の機能（例えば、プロテアーゼ活性、細胞外マトリックス分解酵素活性（好ましくはプロテオグリカン分解酵素活性）などを促進する化合物もしくはその塩（以下、促進剤と略記する場合がある）、または本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の機能を阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

②（i）本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に基質を接触させた場合と（ii）本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に基質お

よび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(i)と(ii)の場合における、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性、細胞外マトリックス分解酵素活性（好ましくはプロテオグリカン分解酵素活性）を測定して、比較することを特徴とするものである。

【0047】本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性は、自体公知の方法、例えば、H. Nagase、メソズブイン エンザイモロジー (Methods in Enzymology)、248巻、449-470 (1995)に記載の方法あるいはそれに準じる方法（具体的には後述の実施例4に記載の方法など）などに従って測定することができる。基質としては、例えば、ペプチドなど（より具体的には、後述の実施例4に記載のMOCAc-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-Lys (DNP)-NH<sub>2</sub>、ペプチド研究所 社製など）などが用いられる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質等を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより本発明のタンパク質等の標品を調製する。バッファーには、pH約4~10（望ましくは、pH約6~8）のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどの、本発明のタンパク質等と基質との反応を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

【0048】例えば、上記(ii)の場合におけるプロテアーゼ活性が上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上上昇させる試験化合物を本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を促進する化合物として、一方、上記(i)の場合におけるプロテアーゼ活性等が上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を阻害する化合物として選択することができる。本発明のタンパク質等の細胞外マトリックス分解酵素活性（特にプロテオグリカン分解酵素活性）は、本発明のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAを含有する組換え体と動物由来の軟骨あるいは軟骨基質産生細胞を混合培養し、培養上清中の硫酸化グリコサミノグリカン量を測定することによって測定することができる。該組換え体としては、発現ベクターの宿主として上記したものに本発明のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAを含有する発現ベクター（例えば、上記の発現ベクターなど）が自体公知の方法で組み

込まれたものであり、本発明のタンパク質を産生して、菌体（細胞）外に分泌する、あるいは細胞膜に結合するものであればいずれのものであってもよく、なかでも動物細胞、昆虫細胞または酵母などが好ましく用いられる。特に動物細胞、なかでもCOS7細胞が好ましく用いられる。培養上清中の硫酸化グリコサミノグリカンの測定方法は、自体公知の方法、例えば、Methods in Enzymology、248巻、47-58頁、1995年に記載の方法に準じて測定することができる。あるいは、市販（コスモバイオ）のヒトアグレカン(PG)ELISAキット等を用いて測定することもできる。該「動物由来の軟骨あるいは軟骨基質産生細胞」の「動物」としては、例えば、温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）があげられ、好ましくはウシなどがあげられる。また、軟骨基質産生細胞としては、例えば動物由来の軟骨細胞、軟骨肉腫細胞、あるいはHCS2/8、ATDC5などの株化細胞があげられる。培養上清中の硫酸化グリコサミノグリカン量が多ければ、細胞外マトリックス分解酵素活性（特にプロテオグリカン分解酵素活性）が高いことを示す。より具体的な、細胞外マトリックス分解酵素活性の測定方法としては、例えば後述の実施例6に記載の方法等があげられる。上記の細胞外マトリックス分解酵素活性（特にプロテオグリカン分解酵素活性）を測定する方法を用いて、例えば、

①被検遺伝子を導入した組換え体と動物由来の軟骨あるいは軟骨基質産生細胞を混合培養し、培養上清中の硫酸化グリコサミノグリカン量を測定することにより、プロテオグリカン分解酵素遺伝子を検出することが可能となる。

30 該「被検遺伝子」としては、ペプチド、タンパク質などをコードする遺伝子であって、該ペプチド、タンパク質などが組換え体により産生され、菌体（細胞）外に分泌する、あるいは細胞膜に結合するものであればいずれのものであってもよい。プロテオグリカン分解酵素が2つ以上の遺伝子にコードされている場合、またプロテオグリカン分解酵素の活性化酵素が必要な場合等、「被検遺伝子」は複数であってもよい。また、必要に応じて、N末端に宿主にあったシグナル配列が付加されていてもよい。さらに、②プロテオグリカン分解酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入した組換え体、動物由来の軟骨あるいは軟骨基質産生細胞および被検物を混合培養し、培養上清中の硫酸化グリコサミノグリカン量を測定することによって、プロテオグリカン分解酵素の活性阻害剤あるいは活性促進剤をスクリーニングすることも可能である。該「プロテオグリカン分解酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入した組換え体」として好ましくは、「本発明のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAを含有する動物細胞」などがあげられ、より好ましくは、「請求項5記載のDNAまたは②配列番号：5で表されるアミノ

酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAを含有する動物細胞」などがあげられる。該「被検物」としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられ、これらは新規物質であっても、公知物質であってもよい。被検物を加えない場合と比べて、培養上清中の硫酸化グリコサミノグリカン量が増加した場合には、被検物はプロテオグリカン分解酵素の活性促進剤と考えられ、被検物を加えない場合と比べて、培養上清中の硫酸化グリコサミノグリカン量が減少した場合には、被検物はプロテオグリカン分解酵素の活性阻害剤と考えられる。また、組換え体、動物由来の軟骨あるいは軟骨基質産生細胞および被検物を同時に添加して混合培養してもよいし、あらかじめ、組換え体と被検物を混合し、組換え体を培養してから、動物由来の軟骨あるいは軟骨基質産生細胞を加えて更に混合培養を行ってもよい。軟骨基質産生細胞の場合、軟骨基質が産生された後に用いることが好ましい。また、動物由来の軟骨あるいは軟骨基質産生細胞を熱処理や凍結融解などで細胞を死滅させて用いてもよい。

【0049】本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質、前駆体タンパク質、部分ペプチドまたはそれらの塩を含有するものである。本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 〔スクリーニング用試薬〕

##### ①測定用緩衝液

250mM トリス塩酸 (pH 7.5)、5mM 塩化カルシウム、10μM塩化亜鉛

##### ②タンパク質標品

本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらの塩

##### ③基質

MOCAc-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-Lys (DNP)-NH<sub>2</sub>

##### ④検出方法

蛍光強度の測定

【0050】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の機能

(例、メプロテアーゼ活性、細胞外マトリックス分解酵素活性(好ましくはプロテオグリカン分解酵素活性)など)を促進または阻害する化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。本発明のタンパク質等の機能(例、プロテアーゼ活性、細胞外マトリックス分解酵素活性(好

ましくはプロテオグリカン分解酵素活性)などを促進する化合物は、例えば、椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病などの疾病に対する治療・予防剤などの医薬として使用できる。一方、本発明のタンパク質等の機能を阻害する化合物は、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節症、骨粗鬆症、癌、動脈硬化、角膜潰瘍などの疾病に対する治療・予防剤などの医薬として有用である。

【0051】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上記の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のタンパク質等を含有する医薬と同様に、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとして使用することができる。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、糖尿病性腎症の治療目的で本発明のタンパク質等の機能を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、糖尿病性腎症の治療目的で本発明のタンパク質等の機能を促進する化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。一方、慢性関節リウマチの治療目的で本発明のタンパク質等の機能を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、慢性関節リウマチの治療目的で本発明のタンパク質等の機能を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0052】(3)本発明のタンパク質、その部分ペプ

チドまたはそれらの塩の定量

本発明のタンパク質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法、および(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法を提供する。上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質等のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

【0053】また、本発明のタンパク質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質等の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、あるいは $Fab$ 画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0054】抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物

理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質等のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0055】本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し

(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用す

るレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0056】これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質等を感度良く定量することができる。さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質等の濃度を定量することによって、①本発明のタンパク質等の濃度の減少が検出された場合、例えば、椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと、また②本発明のタンパク質等の濃度の増加が検出された場合、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節症、骨粗鬆症、癌、動脈硬化、角膜炎などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質等を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質等の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

#### 【0057】(4) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出す

ることができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミックス(Genomics))、第5巻、874~879頁(1989年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユーエスエー(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、第86巻、2766~2770頁(1989年)などにより実施することができる。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下が検出された場合は、例えば、椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病などの疾病である可能性が高いと診断することができる。一方、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合は、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節症、骨粗鬆症、癌、動脈硬化、角膜炎などの疾病である可能性が高いと診断することができる。また、PCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症もしくは大理石病など、または慢性関節リウマチ、変形性関節症、骨粗鬆症、癌、動脈硬化もしくは角膜炎などの疾病である可能性が高いと診断することができる。

【0058】(5) アンチセンスDNAを含有する医薬 本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内における本発明のタンパク質等または本発明のDNAの機能を抑制することができるので、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節症、骨粗鬆症、癌、動脈硬化、角膜炎などなどの治療・予防剤として使用することができる。上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合、前記した本発明のDNAを含有する各種疾病の治療・予防剤と同様にして実施することができる。例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

【0059】(6) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明のタンパク質等の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節症、骨粗鬆症、癌、動脈硬化、角膜潰瘍などの種々の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の慢性関節リウマチの治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤を含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

【0060】非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、 $\text{HCO}-50$  (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアル

コールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5~500mg、とりわけ注射剤では5~100mg、その他の剤形では10~250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

#### 【0061】(7) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質等をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、(1)本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、(2)非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、(3)ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および(4)本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作することもできる。

【0062】非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BAL

B/c 系統, ICR 系統など) またはラット (例えば、Wistar, SD など) などが好ましい。哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどが挙げられる。本発明の外来性 DNA とは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明の DNA ではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明の DNA をいう。本発明の変異 DNA としては、元の本発明の DNA の塩基配列に変異 (例えば、突然変異など) が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じた DNA などが用いられ、また、異常 DNA も含まれる。該異常 DNA としては、異常な本発明のタンパク質を発現させる DNA を意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させる DNA などが用いられる。本発明の外来性 DNA は、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明の DNA を対象動物に転移させるにあたっては、該 DNA を動物細胞で発現させるプロモーターの下流に結合した DNA コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒト DNA を転移させる場合、これと相溶性が高い本発明の DNA を有する各種哺乳動物 (例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来の DNA を発現させる各種プロモーターの下流に、本発明のヒト DNA を結合した DNA コンストラクト (例、ベクターなど) を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明の DNA を高発現する DNA 転移哺乳動物を作出することができる。

【0063】本発明のタンパク質の発現ベクターとして 30  
は、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。上記の DNA 発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス (例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JC ウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど) に由来する DNA のプロモーター、②各種哺乳動物 (ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリン I I、ウロプラキン I I、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質ク、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β、ケラチン K 1, K 10 および K 14、コラーゲン I 型および I I 型、サイクリック AMP 依存タンパク質キナーゼ β I サブユニット、ジス

トロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ (一般に Tie 2 と略される)、ナトリウムカリウムアデノシン 3 リン酸化酵素 (Na, K-ATPase)、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネイン I および I I A、メタロプロティナーゼ 1 組織インヒビター、MHC クラス I 抗原 (H-2 L)、H-ras、レニン、ドーパミン β-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO)、ポリペプチド鎖延長因子 1α (EF-1α)、β アクチン、α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖 1 および 2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H 鎖可変部 (V NP)、血清アミロイド P コンポーネント、ミオグロビン、トロポニン C、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリン A、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子 1α (EF-1α) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

【0064】上記ベクターは、DNA 転移哺乳動物において目的とするメッセンジャー RNA の転写を終結する配列 (一般にターミネーターと呼ばれる) を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各 DNA の配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスの SV 40 ターミネーターなどが用いられる。その他、目的とする外来性 DNA をさらに高発現させる目的で各 DNA のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核 DNA のイントロンの一部などをプロモーター領域の 5' 上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の 3' 下流に連結することも目的により可能である。正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物 (例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来 DNA および市販の各種ゲノム DNA ライブラリーよりゲノム DNA の全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来 RNA より公知の方法により調製された相補 DNA を原料として取得することが出来る。また、外来性の異常 DNA は、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。該翻訳領域は転移動物において発現しうる DNA コンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常の DNA 工学的手法により作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の外来性 DNA の転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA 転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性 DNA が存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体



細胞のすべてに本発明の外來性DNAを保持することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性DNAを有する。

【0065】本発明の外來性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外來性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質に関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。また、本発明の外來性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

【0066】一方、本発明の外來性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外來DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように

繁殖継代することができる。本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害 (dominant negative作用) を解明するモデルとなる。また、本発明の外來異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

【0067】また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたタンパク質組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性についての解析、
- ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- ④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- ⑤本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行



なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

#### 【0068】(8) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、(1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、

(2) 該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子)を導入することにより不活性化された第(1)項記載の胚幹細胞、(3) ネオマイシン耐性である第(1)項記載の胚幹細胞、(4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)項記載の胚幹細胞、(5) ゲッ歯動物がマウスである第(4)項記載の胚幹細胞、(6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、(7) 該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ

遺伝子)を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、

(8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、(9) ゲッ歯動物がマウスである第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および(10) 第(7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0069】本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない(以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある)非ヒト哺乳動物の胚幹細胞(以下、ES細胞と略記する)をいう。非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞(以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する)の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が

有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ(β-ガラクトシダーゼ遺伝子)、cat(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子)を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列(例えば、polyA付加シグナルなど)を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖(以下、ターゲッティングベクターと略記する)を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

【0070】また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス(C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>)を用いて樹立したものなども良好に用いうる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例として挙げることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10<sup>6</sup>個の細胞数を要していたのに対し

て、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

【0071】また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF(1-10000U/ml)存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気)で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり[M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschmanら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0072】本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のD

NAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

【0073】このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を

作出する上で、非常に有用である。また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

【0074】(8a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病（例、椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病など）に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することの特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが挙げられる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。例えば、椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に糖負荷処置を行ない、糖負荷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の血糖値および体重変化などを経時的に測定する。該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の血糖値が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

【0075】本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物

であり、本発明のタンパク質等の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患（例、椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病など）に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様に製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、の治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、糖尿病性腎症の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0076】(8b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することの特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入す

ることにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。試験化合物としては、前記と同様のものが挙げられる。レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子

(lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

【0077】例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド(X-gal)のような $\beta$ -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

【0078】上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸など)や塩基(例、有機酸など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病などの疾病に対する安

全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。一方、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を阻害し、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節症、骨粗鬆症、癌、動脈硬化、角膜潰瘍などの疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

【0079】該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、糖尿病性腎症の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、糖尿病性腎症の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。一方、例えば、慢性関節リウマチの治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、慢性関節リウマチの治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩を

スクリーニングする上で極めて有用であり、本発明の DNA 発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有する DNA を使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパクを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現 10 するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質その\*

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
I	: イノシン
R	: アデニン (A) またはグアニン (G)
Y	: チミン (T) またはシトシン (C)
M	: アデニン (A) またはシトシン (C)
K	: グアニン (G) またはチミン (T)
S	: グアニン (G) またはシトシン (C)
W	: アデニン (A) またはチミン (T)
B	: グアニン (G)、グアニン (G) またはチミン (T)
D	: アデニン (A)、グアニン (G) またはチミン (T)
V	: アデニン (A)、グアニン (G) またはシトシン (C)
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

## 【0081】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン

\* のものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

【0080】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ L 体を示すものとする。

H i s	: ヒスチジン
P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン
p G l u	: ピログルタミン酸

【0082】また、本明細書中で繁用される置換基、保\* \* 護基および試薬を下記の記号で表記する。

M e	: メチル基
E t	: エチル基
B u	: ブチル基
P h	: フェニル基
T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
T o s	: p -トルエンスルフォニル
C H O	: ホルミル
B z l	: ベンジル
C l <sub>2</sub> Bz l	: 2, 6 -ジクロロベンジル
B o m	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
C l - Z	: 2 -クロロベンジルオキシカルボニル
B r - Z	: 2 -ブロモベンジルオキシカルボニル
B o c	: t -ブトキシカルボニル
D N P	: ジニトロフェニル
T r t	: トリチル
B u m	: t -ブトキシメチル
F m o c	: N -9 -フルオレニルメトキシカルボニル
H O B t	: 1 -ヒドロキシベンゾトリアゾール
H O O B t	: 3, 4 -ジヒドロ-3 -ヒドロキシ-4 -オキソ- 1, 2, 3 -ベンゾトリアジン
H O N B	: 1 -ヒドロキシ-5 -ノルボルネン-2, 3 -ジカルボキシイミド
D C C	: N, N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド
M O C A c	: (7 -メトキシマリニン-4 -イル) アセチル
N v a	: ノルバリン
N m a	: N -メチルアントラニル酸

【0083】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕実施例1で得られた新規ADAMタンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕配列番号：1または配列番号：15で表されるアミノ酸配列で表されるタンパク質のディスインテグリン領域に相当する部分のアミノ酸配列を示す。  
配列番号：1で表されるアミノ酸配列の第400番目～495番目のアミノ酸配列に相当する。

〔配列番号：3〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

【0084】〔配列番号：5〕配列番号：1または配列番号：15で表されるアミノ酸配列で表されるタンパク質のメタロプロテアーゼ領域に相当する部分のアミノ酸配列を示す。配列番号：1で表されるアミノ酸配列の第199番目～399番目のアミノ酸配列に相当する。

〔配列番号：6〕本発明のタンパク質の部分ペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1または配列番号：15で表されるアミノ酸配列の第428番目～437番目のアミノ酸配列に相当する。

〔配列番号：7〕実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕実施例1で得られた新規ADAMタンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：16〕配列番号：15で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕実施例2で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕実施例2で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕実施例5で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕実施例5で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕実施例8で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕実施例8で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕実施例9で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕実施例9で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

【0085】後述の実施例1で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (Escherichia coli) DH5 $\alpha$ /pTB2052は、平成10年8月26日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-6474として、平成10年5月20日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号 IFO 16173として寄託されている。後述の実施例1で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (Escherichia coli) DH5 $\alpha$ /pTB2053は、平成10年8月26日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-6475と

して、平成10年5月20日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号 IFO 16174として寄託されている。後述の実施例9で得られたベクターpTB2076により形質転換された形質転換体エシエリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/pTB2076は、平成11年8月23日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-6857として、平成11年8月4日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号 IFO 16305として寄託されている。

#### 【0086】

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれ限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

#### 【0087】

【実施例1】新規ADAMタンパク質をコードする遺伝子のクローニング  
ADAMファミリーで保存されている領域を基に設計したプライマー [GT(A/G)GAI(C/G)(A/C)(A/G/T)(G/T)(C/G)(A/G/T)GA(A/G)(C/G)A(A/G)TGTGA (配列番号：7)] および [A(C/T)(C/T)TG(A/T)(A/G/T)(C/G/T)(A/G)(A/G/T)(A/G/T)(A/T)IC(A/G/T)(G/T)(A/C/G)(A/G/T)(A/G/T)(C/G)IGGGCA (配列番号：8)] を用い、種々のヒトcDNAを鋳型として縮重PCRを行った (95℃で20秒、40℃で10秒、72℃で1分を40回)。得られた増幅DNA断片の塩基配列を決定した結果、出血性蛇毒であるAtrolysineに高い相同性を示す配列が見出された。この遺伝子の全長を取得するため、以下のようにRACE (rapid amplification of cDNA ends) 法を用いた。まず、上記で見出された配列を基にプライマーを設計し、これらのプライマー [ATC ACA GTC CTC TCC CAT TTC CAC CAA C (配列番号：9)] および [CAC ATTTCA GGC AGG TCG CAC TCA TC (配列番号：10)] とCLONTECH社製Marathon cDNA Amplification Kit 添付のAP1、AP2プライマーを用いて、Marathon ready cDNA (CLONTECH社製) を鋳型としてキット添付のプロトコールに従いPCRを行い、5' 上流断片のクローニングを試みた。翻訳開始コドンを含む断片が取得できなかったため、さらに、得られた断片の配列を基に設計したプライマー [TCG CTG TGG TCC TGA ACA ACG CCA ACA (配列番号：11)] および [CAC ACC ATC CATCCC ACA GGT GCT GTC A (配列番号：12)] を用いて、5' 上流断片のクローニングを上記と同様の方法で行った。得られたPCR断片は翻訳開始コドンと思われる配列を含んでいた。一方3' 下流断片をクローニングするためにプライマー [GGA ACC AGT TGG TGG AAA TGG GAG AGG A (配列番号：13)] および [AGG ACT GTG ATT GTG GGA CGT CTG AGG AA (配列番号：14)] を設計し、上記と同様の方法でPCRを行

った。その結果、蛋白コード領域中の途中部分から全く異なる配列を示す2種のクローンが得られた。以上RACE法で得られた遺伝子断片を連結し、発現ベクターpCDNA3.1 (Invitrogen社製) に挿入することにより、pTB2052及びpTB2053を得た。pTB2052は図3および図4に示される塩基配列(配列番号: 16で示される2325個の塩基配列を含む)を有していた。このcDNA断片には、図3および図4(配列番号: 15)で表される775アミノ酸からなる新しいADAMタンパク質がコードされ、シグナル配列、プロ領域、メタロプロテアーゼ領域、ディスインテグリン領域、システインリッチ領域、膜貫通領域、及び細胞内領域が認められた。pTB2052を公知の方法で、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ に導入し、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ /pTB2052を得た。一方、pTB2053は図1および図2に示される塩基配列(配列番号: 3で示される1620個の塩基配列を含む)を有していた。このcDNA断片には、配列番号: 1で表される540アミノ酸からなる新しいADAMタンパク質がコードされ、シグナル配列、プロ領域、メタロプロテアーゼ領域、ディスインテグリン領域、及び一部のシステインリッチ領域が認められた。pTB2053を公知の方法で、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ に導入し、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ /pTB2053を得た。

#### 【0088】

##### 【実施例2】大腸菌発現ベクターの構築

本発明のADAMタンパク質のメタロプロテアーゼ領域とディスインテグリン領域を大腸菌において発現を行った。すなわち、実施例1で得たpTB2053をテンプレートとし、2種のプライマー [CAT ATG GTT CAG GAA CAT GAG AAA TAC ATA (配列番号: 17)] および [CTC GAG GAA GCC ATT GAC TTG GAA TCT ATC (配列番号: 18)] を用いてPfu turbo (STRATAGENE社製) のプロトコールに従いPCR反応(95℃で20秒、55℃で10秒、72℃で2分、25回)を行った。PCR反応液を1%アガロースゲルで電気泳動後、900bp付近のバンドを回収し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて精製した。これをpCR-Bluntベクター (INVITROGEN社製) に挿入し、大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換した。この大腸菌よりプラスミドを抽出し、NdeIとXhoIで切断し、同様に処理したpET21a (NOVAGEN社製) とライゲーションを行った後、大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換した。次にこの形質転換体よりプラスミド(pMDH)を抽出し、配列に誤りのないことを確認した。

#### 【0089】

【実施例3】組換え型ADAMタンパク質の大腸菌での発現と精製  
実施例2で得られたプラスミドpMDHで大腸菌BL21(DE3)を形質転換し、発現に用いた。発現誘導は1mMの

イソプロピルチオガラクトピラノシドで行い、精製はNi-NTA Agarose (QIAGEN社製) を用いて添付のマニュアルに従った。その結果、目的の約35kDaの組換え型ADAMタンパク質はバッファーE (A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, QIAGEN社) で溶出された。次に分画分子量6,000~8,000の透析膜 (SPECTRUM MEDICAL社製) を用いて4℃にて緩衝液[0.2M トリス-塩酸 (pH 9.0), 3mM 2-メルカプトエタノール, 0.3mM 2-ヒドロキシエチルジスルフィド, 2M尿素, 0.1%トリトンX-100]に対して3時間透析後、緩衝液[0.2M トリス-塩酸 (pH 8.5), 3mM 2-メルカプトエタノール, 0.3mM 2-ヒドロキシエチルジスルフィド, 0.5M尿素, 0.1%トリトンX-100]で2時間、緩衝液[50mM トリス-塩酸 (pH 8.0), 1mM 2-メルカプトエタノール, 0.1mM 2-ヒドロキシエチルジスルフィド, 0.1M尿素, 0.05%トリトンX-100, 150mM塩化ナトリウム]で3時間、緩衝液[50mM トリス-塩酸 (pH 7.5), 0.05%トリトンX-100, 150mM塩化ナトリウム]で16時間透析した。このようにして500mLの培養液から3.9mgの組換え型ADAMタンパク質が取得できた。

#### 【0090】

【実施例4】組換え型ADAMタンパク質のプロテアーゼ活性の検出

96穴プレート(フルオロBプレート、大日本製薬製)に30 $\mu$ Lの緩衝液[250mM トリス-塩酸 (pH 7.5), 5mM塩化カルシウム、10 $\mu$ M塩化亜鉛]と実施例3で得られた組換え型ADAMタンパク質(0.8mg/mL)を20 $\mu$ L添加した。37℃にて10分間ブレインキュベーション後、10 $\mu$ Mの基質[MOCAc-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-Lys (DNP)-NH<sub>2</sub>, ペプチド研究所 社製]を100 $\mu$ L添加することによって酵素反応を開始した。37℃にて22時間反応後マイクロプレートリーダー (Applied Biosystems 社製) を用いて励起波長328nm, 吸収波長393nmで反応液中の蛍光強度を測定した。組換え型ADAMタンパク質無添加の場合の蛍光強度が2であったのに対し、添加した場合は70の蛍光強度を示した。これらのことから、本ADAMタンパク質はプロテアーゼ活性を有することが明らかになった。この、アッセイ系を用いて本発明のADAMタンパク質のプロテアーゼ活性を調節(阻害及び促進)する物質の探索が可能と考えられる。

#### 【0091】

【実施例5】ディスインテグリン領域10アミノ酸欠失型発現プラスミドの調製

国際公開公報 (WO 97/09430) 記載の遺伝子は、本発明



で得られた遺伝子(配列番号: 3)と比較すると蛋白コード領域中ディスインテグリン領域に30塩基対(10アミノ酸)を欠失した遺伝子である。この遺伝子由来のタンパク質と本発明にて得られた遺伝子由来のタンパク質の活性を比較するため国際公開公報(W097/09430)記載の遺伝子を以下の方法で取得した。すなわち、5'側をリン酸化した2種のプライマー[CTC AGA TGT CCC ACA ATC ACA GTC(配列番号: 19)]および[ACA TGT AAA ATC AAA GCA ACT TTT C(配列番号: 20)]を用いて実施例1で得たpTB2053をテンプレートとし、Pf u turbo (STRATAGENE社製)のプロトコールに従いPCR反応(96℃で30秒、56℃で30秒、72℃で12分、30回)を行った。PCR反応液を1%アガロースゲルで電気泳動後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて精製した。これをT4リガーゼ(ニッポンジーン社製)を用いて自己環状化させ、大腸菌DH5αにトランスフォーメーションした。次にこの大腸菌よりプラスミドを抽出し、塩基配列を決定し、特許(W097/09430)記載の遺伝子コーディング領域がpCDNA3.1に挿入された発現プラスミド(pATR-CT)

## 【0092】

【実施例6】ウシ鼻軟骨プロテオグリカン分解活性の比較

ウシ鼻中隔部分より軟骨を採取し、直径4mmコルクボーラーを用いて円筒形に切断後、その円筒形軟骨をメスで厚さ約1mmに切断し、ディスク状の軟骨片とした。次にこの軟骨片を-80℃及び37℃にて凍結、融解を5回行い、最後に65℃で20分加熱処理して以下の活性測定用の基質として用いた。1日前に1×10<sup>4</sup>個ずつ48穴プレートに播き、培養しておいたCOS7細胞を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクションはFugene6(ベーリンガー・マンハイム社製)を用い、そのプロトコールに従った。トランスフェクション4時間後、上記で得られたディスク状ウシ軟骨片を添加し、37℃にてさらに培養を継続した。培養2日後、上清中の硫酸化グリコサミノグリカンをC. J. HandleyとD. J. Buttleの方法(Methods in Enzymology 248:47-58, 1995)に従って測定し、各種遺伝子導入によるプロテオグリカン分解亢進を比較した。その結果を下表に示すが、pTB2052、pTB2053のトランスフェクションによってプロテオグリカン分解は有意に亢進し、国際公開公報(W097/09430)記載の遺伝子では明らかな分解は認められなかった。

## 【表1】

導入したプラスミド	SGAG (mg/ml)	SD value
mock transfection	34.11	3.64
pTB2052	62.17	11.77
pTB2053	57.03	10.60
pATR-CT	38.28	16.02

SGAG(硫酸化グリコサミノグリカン)値は4連の実験の平均値

## 【0093】

【実施例7】抗ADAMタンパク質ポリクローナル抗体の取得

実施例3で得られた組換え型ヒトADAMタンパク質(200μg)を完全フロイントアジュバントに懸濁し、日本白色ウサギに初回免疫を行った。以後、2週間ごと4回、400μgの組換え型ヒトADAMタンパク質を不完全フロイントアジュバントに懸濁し、日本白色ウサギに免疫を行った。最終免疫の1週間後に全採血することにより、約50mlの血清が取得できた。抗体価の測定は以下のように行行った。組換え型ヒトADAMタンパク質を0.5μg/ウェルとなるように固定化した後、BSAでブロッキングした96穴プレートに希釈したウサギ血清を添加し、室温で2時間静置した。0.1%Tween-20を含むPBSで洗浄後、抗ウサギIgG-パーオキシダーゼ(Cappel社)を加え、2時間静置した。洗浄後、0-フェニレンジアミンと過酸化水素を含むクエン酸-リン酸緩衝液を加え、20分間発色させた。反応を1M硫酸で停止させた後、プレートリーダーを用いて492nmの発色を測定した。その結果、非免疫ウサギの約1万倍の抗体価を示す抗血清が得られた。

## 【0094】

【実施例8】ラットII型コラーゲン遺伝子のプロモーター及びエンハンサーのクローニング

ラットII型コラーゲン遺伝子のプロモーター領域は、Kohnら(J. Biol. Chem 260:4441, 1985)の塩基配列をもとに設計したプライマー[5'-GTGGTGGTGGACAAGTAGGAACTCTGG-3'(配列番号: 21)]および[5'-CGAGGC GAATCATGGCTCACC GCG-3'(配列番号: 22)]を用いてPCR法により得た。得られた約1.2kbの断片をTOPO TA Cloning Kit(Invitrogen社)を用い、プロトコールに従い添付のpCRII-TOPOにクローニングした(pCRII-promoter 2)。その塩基配列をABI社製DNAシーケンサーで常法により確認した。pCRIIプラスミドのマルチプルクローニングサイトのNotI(5'側)とプロモーター配列内のSmaIサイトで切り出し、実験に用いた。ラットII型コラーゲン遺伝子のエンハンサー領域は、Krebsbachら(J. Biol. Chem 271:4298, 1996)の塩基配列をもとにMluIサイトが生じるように設計したプライマー[5'-TCCACGCGT TTGGGAACTCTTGGCTGCG-3'(配列番号: 23)]および[5'-GCTTCGTCGCCGCTACGCGTGGGCGGGA-3'(配列番号: 24)]を用いてPCR法により得た。得られた0.3

5kbのMluI断片の塩基配列をABI社製DNAシーケンサーで常法により確認した。次にそのMluI断片にEcoRIリンカーを付与し、pBluescript KSII+のEcoRIサイトに挿入した(pKS-enhancer 1-4)。

#### 【0095】

【実施例9】DNA転移ラット用発現ベクターの作成  
DNA転移ラット用発現ベクター、pTB2076(図5)を常法に基づいて構築した。本プラスミドは下記の1)から5)までの断片がpBluescriptII KS+のNotIサイトに挿入されたものである。

1) Col2A1 promoter: ラットII型コラーゲン遺伝子のプロモーター領域、実施例8に記載のpCRIIのマルチプルクローニングサイト内のNotIからII型コラーゲン遺伝子プロモーター内にあるSmaIサイトまでの1,120bp断片(SmaIサイトをSalIサイトに変換)。

2) SV40 splicing: pTB399(R. Sasadaら、Cell Structure and Function 12:205,1987)由来のスプライシングサイトを含む断片の5'側をSalI、3'側をClaIに改変したもの。

3) ADAM: 新規ADAM遺伝子。実施例1で取得したプラスミド(pTB2052)を鋳型として、合成プライマー[5'-ATC GAT TGA GCG AGA AGA GCA GAC ACC-3' (配列番号: 25)]及び[5'-AGA TCT TGC CAT CCA GAT TTT CCA GTT T-3' (配列番号: 26)]を用いてPfu turbo (STRATAGENE)を使用して、PCR反応(95℃、20秒、52℃、10秒、72℃、3分、を30サイクル)を行い、5'側にClaIサイト、3'側にBglIIサイトを付与した約2.4Kbの遺伝子断片(図3及び4の13番目から2448番目の塩基に対応する)。

4) SV40 polyA: pTB399(R. Sasadaら、Cell Structure and Function 12:205,1987)由来のpolyA付加シグナルを含むBglII、HindIII断片。

5) Col2A1 enhancer: 実施例8に記載したラットII型コラーゲン遺伝子のエンハンサー領域を含むpKS-enhancer 1-4のHindIIIサイトからNotIサイトまでの断片。

#### 【0096】

##### 【実施例10】DNA転移ラットの作出

採卵用としてラットSD(ISG)系統を8週齢で購入し、7:00~19:00 12時間明期条件で1週間飼育し、まず1日目11:00に卵胞刺激ホルモン(妊馬血清性腺刺激ホルモン、一般にPMSGと略する)(30IU/個体)を腹腔注射し、3日目11:00に黄体形成ホルモン(ヒト絨毛性腺刺激ホルモン、一般にhCGと略する)(5IU/個体)を腹腔注射して雄ラットSD(ISG)系統10週齢以降の個体と14:00以降に1:1で同居、交配させた。4日目9:00に交配させた雌ラットの膣栓確認を行い、13:30から膣栓確認した個体を屠殺後、採卵を開始した。受精卵で前核形成卵を選択し、14:30から実施例9で得られたプラスミドpTB2076をNotIによって切断し、新規ADAM遺伝子を含む断片を10μg/mlの濃度に調製し、その1~2μlを顕微鏡下で観察し

ながら受精した単細胞期のSD系統ラット卵の雄前核へ注入した。続いて、卵細胞を自体公知のHER培地で培養し、5日目13:30に2細胞期胚を確認してから、Wagnerら(Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A., 78:5016,1981)により記載された方法に従って、偽妊娠の雌Wistar系統ラットの卵管に移植し、着床させた。偽妊娠の雌Wistar系統ラット(11週齢以降)は0日目11:00にコンセラル(武田薬品工業)を皮下注射(50μg/個体)し、4日目15:00以降に雄Wistar系統12週以降の個体と1:1で同居、交配させた。5日目9:00に交配させた雌ラットの膣栓確認を行い、上記の目的で使用した。

#### 【0097】

##### 【実施例11】DNA転移ラットの遺伝子解析

3週齢に達した出産仔の尾からB. Hoganら(Manipulating The Mouse embryo, 1986, Cold Spring Harbor Laboratories)の方法で採取したDNAを用いて、実施例8記載のラットII型コラーゲンプロモーター配列を基に設計したプライマー[5'-CGCCGCTGGGCTGCCGGGTC-3' (配列番号: 27)]、実施例1記載の新規ADAMタンパク質遺伝子配列を基に設計したプライマー(配列番号: 16で表わされる塩基配列のうち、第293番目から第308番目までの塩基に対応する塩基配列に相補的な塩基配列からなるDNA断片)[5'-TCCATCCCGATGTATGGGC-3' (配列番号: 28)]を用いてPCRを行った。

合計95個体の産仔ラットを解析した結果、780bpのPCR断片が検出できたPCR陽性個体は6個体であった。これら6個体のPCR陽性個体のゲノムDNAをサザンハイブリダイゼーション法により解析した。すなわち、10μgのDNAをHindIIIで完全に切断し、1.0%アガロースゲル電気泳動後、ナイロンフィルターへ移した。このフィルターを、実施例9で用いた新規ADAM遺伝子(約2.4Kbの遺伝子断片(図3及び4の13番目から2448番目の塩基に対応する))をDIG DNAラベリングキット(ベリンガー・マンハイム社製)で標識したプローブと一晚ハイブリダイズし、2xSSC、0.1%SDSにて室温で2回洗浄し、次に0.1xSSC、0.1%SDSにて68℃で2回洗浄した。検出にはDIG蛍光検出キット(ベリンガー・マンハイム社製)を用いた。その結果、これらの6個体には全て1.9Kbの断片が観察され、新規ADAM遺伝子の導入が確認された。また、導入された遺伝子のコピー数は、個体番号RCA-14(雌)が40コピー、RCA-22(雄)が5コピー、RCA-50(雄)が40コピー、RCA-79(雄)が2コピー、RCA-83(雌)が10コピー、RCA-86(雄)が40コピーであることが確認された。

#### 【0098】

【実施例12】DNA転移ラットの尾椎でのヒトADAMタンパク質の発現

DNA転移ラットRCA-14(雌)の尾椎末端組織、約5mmを生体より切り出した。この組織を4%パラホルムアルデヒドにて室温で一晩固定した。その後、70%エタノール

にて室温で24時間脱脂後、0.5M EDTA (pH=8.0)にて室温で2週間脱灰した。脱灰完了は針で組織を突き刺して容易に貫通することで確かめた。脱灰完了後、室温にて2時間水洗し、常法（組織学研究法、佐野豊、南山堂）に従ってパラフィンブロックを作製した。ブロックは薄切まで4℃で保存した。薄切時にブロックを室温まで戻し、切片を5マイクロメートルにて薄切し、温水上で伸展後、スライドガラス上にマウントし、一晚37℃にて乾燥させた。免疫染色は実施例7記載のウサギポリクローナル抗体を一次抗体に使用し、vectastain ABC universal kit (Vector社)のプロトコールに従って行った。発色はperoxidase substrate AEC kit (Vector社)を用い、添付プロトコールに従って発色させた。その結果、DNA転移ラットRCA-14 (雌)の尾椎末端軟骨組織中の増殖軟骨細胞から肥大軟骨細胞層にかけて本発明の新規ヒトADAMタンパク質の存在が確認された。こうして得られた本発明の新規ADAM遺伝子を組み込んだDNA転移ラットは、慢性関節リウマチや変形性などの関節の変形、損傷を伴う関節症関節疾患、骨疾患、および慢性炎症性疾患などを発症することがあり、その疾患モデル動物として利用することができる。さらに、本発明のDNA転移ラットを用いて、これら病態機序の解明およびこれら疾患を治療方法の検討を行うことが可能である。また本発明のDNA転移ラットの作製方法により、目的とする遺伝子DNA転移ラットを効率的に高収率で得ることができる。

#### 【0099】

【実施例13】ADAMタンパク質のプロテアーゼ活性を調節する物質の探索

実施例3に記載した方法と同様にして得たADAMタンパク質溶液(25 $\mu$ l)に75 $\mu$ lの緩衝液(83.3 mM Tris-HCl、pH 7.5、16.7 mM NaCl、1.67 mM CaCl<sub>2</sub>、16.7 $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>、0.067% BSA)を加えた後、25 $\mu$ lの基質溶液(50 $\mu$ M Nma\*

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Protein and its DNA

<130> A98134

<150> JP 10-250115

<151> 1998-09-03

<160> 28

<210> 1

<211> 540

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Leu Gln Gly Leu Leu Pro Val Ser Leu Leu Leu Ser Val Ala Val

1

5

10

15

Ser Ala Ile Lys Glu Leu Pro Gly Val Lys Lys Tyr Glu Val Val Tyr

20

25

30

Pro Ile Arg Leu His Pro Leu His Lys Arg Glu Ala Lys Glu Pro Glu

35

40 50

45

\*-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-Trp-Lys(DNP)-NH<sub>2</sub>、0.05% BSA、5% DMSO)を添加することにより酵素反応を開始した。37℃で2時間保温後、100 $\mu$ lの0.5M酢酸緩衝液(pH 3.0)を加え、酵素反応を停止した。酵素液を加えない場合の蛍光強度(励起波長340nm、測定波長450nmで蛍光プレートリーダー(コロナMTP-32)を用いて、蛍光強度を測定した。)が10であるのに対し、酵素液を加えた時の蛍光強度は180であった。従って、本条件においても本ADAMタンパク質はプロテアーゼ活性を示すことが明らかになった。10 $\mu$ lの所定の濃度に調整した被検化合物(50% DMSOに溶解)を上記の活性測定系に加えた。その結果、actinonin(シグマ社 A6671)は0.6mMのIC<sub>50</sub>値(プロテアーゼ活性を50%阻害する被検化合物の濃度)を、N-CBZ-Pro-Leu-Gly hydroxamate(シグマ社 C8537)は約0.1mMのIC<sub>50</sub>値を示した。このことから、本アッセイ系を用いて本発明のADAMタンパク質のプロテアーゼ活性を調節(阻害あるいは促進)する物質の探索が可能と考えられた。

#### 【0100】

【発明の効果】本発明のタンパク質およびそれをコードするDNAは、例えば、椎間板ヘルニア、坐骨神経痛、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝繊維症、肺繊維症または大理石病などの疾病の治療・予防剤として使用することができる。また、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質のプロテアーゼ活性および/または細胞外マトリックス分解酵素活性(特にプロテオグリカン分解酵素活性)を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。さらに、本発明のタンパク質に対する抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量などに使用することができる。

#### 【0101】

##### 【配列表】

65															66	
Gln	Gln	Glu	Gln	Phe	Glu	Thr	Glu	Leu	Lys	Tyr	Lys	Met	Thr	Ile	Asn	
50					55					60						
Gly	Lys	Ile	Ala	Val	Leu	Tyr	Leu	Lys	Lys	Asn	Lys	Asn	Leu	Leu	Ala	
65					70					75					80	
Pro	Gly	Tyr	Thr	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Thr	Gly	Lys	Glu	Ile	Thr	
85					90					95						
Thr	Ser	Pro	Gln	Ile	Met	Asp	Asp	Cys	Tyr	Tyr	Gln	Gly	His	Ile	Leu	
100					105					110						
Asn	Glu	Lys	Val	Ser	Asp	Ala	Ser	Ile	Ser	Thr	Cys	Arg	Gly	Leu	Arg	
115					120					125						
Gly	Tyr	Phe	Ser	Gln	Gly	Asp	Gln	Arg	Tyr	Phe	Ile	Glu	Pro	Leu	Ser	
130					135					140						
Pro	Ile	His	Arg	Asp	Gly	Gln	Glu	His	Ala	Leu	Phe	Lys	Tyr	Asn	Pro	
145					150					155					160	
Asp	Glu	Lys	Asn	Tyr	Asp	Ser	Thr	Cys	Gly	Met	Asp	Gly	Val	Leu	Trp	
165					170					175						
Ala	His	Asp	Leu	Gln	Gln	Asn	Ile	Ala	Leu	Pro	Ala	Thr	Lys	Leu	Val	
180					185					190						
Lys	Leu	Lys	Asp	Arg	Lys	Val	Gln	Glu	His	Glu	Lys	Tyr	Ile	Glu	Tyr	
195					200					205						
Tyr	Leu	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Glu	Phe	Lys	Arg	Tyr	Asn	Glu	Asn	Gln	
210					215					220						
Asp	Glu	Ile	Arg	Lys	Arg	Val	Phe	Glu	Met	Ala	Asn	Tyr	Val	Asn	Met	
225					230					235					240	
Leu	Tyr	Lys	Lys	Leu	Asn	Thr	His	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Met	Glu	Ile	
245					250					255						
Trp	Thr	Asp	Lys	Asp	Lys	Ile	Lys	Ile	Thr	Pro	Asn	Ala	Ser	Phe	Thr	
260					265					270						
Leu	Glu	Asn	Phe	Ser	Lys	Trp	Arg	Gly	Ser	Val	Leu	Ser	Arg	Arg	Lys	
275					280					285						
Arg	His	Asp	Ile	Ala	Gln	Leu	Ile	Thr	Ala	Thr	Glu	Leu	Ala	Gly	Thr	
290					295					300						
Thr	Val	Gly	Leu	Ala	Phe	Met	Ser	Thr	Met	Cys	Ser	Pro	Tyr	Ser	Val	
305					310					315					320	
Gly	Val	Val	Gln	Asp	His	Ser	Asp	Asn	Leu	Leu	Arg	Val	Ala	Gly	Thr	
325					330					335						
Met	Ala	His	Glu	Met	Gly	His	Asn	Phe	Gly	Met	Phe	His	Asp	Asp	Tyr	
340					345					350						
Ser	Cys	Lys	Cys	Pro	Ser	Thr	Ile	Cys	Val	Met	Asp	Lys	Ala	Leu	Ser	
355					360					365						
Phe	Tyr	Ile	Pro	Thr	Asp	Phe	Ser	Ser	Cys	Ser	Arg	Leu	Ser	Tyr	Asp	
370					375					380						
Lys	Phe	Phe	Glu	Asp	Lys	Leu	Ser	Asn	Cys	Leu	Phe	Asn	Ala	Pro	Leu	
385					390					395					400	
Pro	Thr	Asp	Ile	Ile	Ser	Thr	Pro	Ile	Cys	Gly	Asn	Gln	Leu	Val	Glu	
405					410					415						
Met	Gly	Glu	Asp	Cys	Asp	Cys	Gly	Thr	Ser	Glu	Glu	Cys	Thr	Asn	Ile	
420					425					430						
Cys	Cys	Asp	Ala	Lys	Thr	Cys	Lys	Ile	Lys	Ala	Thr	Phe	Gln	Cys	Ala	
435					440					50		445				

67 68  
 Leu Gly Glu Cys Cys Glu Lys Cys Gln Phe Lys Lys Ala Gly Met Val  
 450 455 460  
 Cys Arg Pro Ala Lys Asp Glu Cys Asp Leu Pro Glu Met Cys Asn Gly  
 465 470 475 480  
 Lys Ser Gly Asn Cys Pro Asp Asp Arg Phe Gln Val Asn Gly Phe Pro  
 485 490 495  
 Cys His His Gly Lys Gly His Cys Leu Met Gly Thr Cys Pro Thr Leu  
 500 505 510  
 Gln Glu Gln Cys Thr Glu Leu Trp Gly Pro Gly Arg Arg Thr Asn Pro  
 515 520 525  
 Phe Pro Cys Ala Cys Ala Lys Glu Asn His Phe Arg  
 530 535 540

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 96

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

Leu Pro Thr Asp Ile Ile Ser Thr Pro Ile Cys Gly Asn Gln Leu Val  
 1 5 10 15  
 Glu Met Gly Glu Asp Cys Asp Cys Gly Thr Ser Glu Glu Cys Thr Asn  
 20 25 30  
 Ile Cys Cys Asp Ala Lys Thr Cys Lys Ile Lys Ala Thr Phe Gln Cys  
 35 40 45  
 Ala Leu Gly Glu Cys Cys Glu Lys Cys Gln Phe Lys Lys Ala Gly Met  
 50 55 60  
 Val Cys Arg Pro Ala Lys Asp Glu Cys Asp Leu Pro Glu Met Cys Asn  
 65 70 75 80  
 Gly Lys Ser Gly Asn Cys Pro Asp Asp Arg Phe Gln Val Asn Gly Phe  
 85 90 95 96

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1620

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 3

ATGTTGCAAG GTCTCCTGCC AGTCAGTCTC CTCCTCTCTG TTGCAGTAAG TGCTATAAAA 60  
 GAACTCCCTG GGGTGAAGAA GTATGAAGTG GTTTATCCTA TAAGACTTCA TCCACTGCAT 120  
 AAAAGAGAGG CCAAAGAGCC AGAGCAACAG GAACAATTTG AAACTGAATT AAAGTATAAA 180  
 ATGACAATTA ATGGAAAAAT TGCAGTGCTT TATTTGAAAA AAAACAAGAA CCTCCTTGCA 240  
 CCAGGCTACA CGGAAACATA TTATAATTCC ACTGGAAAGG AGATCACCAC AAGCCCACAA 300  
 ATTATGGATG ATTGTTATTA TCAAGGACAT ATTCTTAATG AAAAGGTTTC TGACGCTAGC 360  
 ATCAGCACAT GTAGGGGTCT AAGGGGCTAC TTCAGTCAGG GGGATCAAAG ATACTTTATT 420  
 GAACCTTTAA GCCCCATACA TCGGGATGGA CAGGAGCATG CACTCTTCAA GTATAACCCT 480  
 GATGAAAAGA ATTATGACAG CACCTGTGGG ATGGATGGTG TGTGTGGGC CCACGATTTG 540  
 CAGCAGAACA TTGCCCTACC TGCCACCAAA CTAGTAAAAT TGAAAGACAG GAAGGTTTCA 600  
 GAACATGAGA AATACATAGA ATATTATTTG GTCCTGGATA ATGGTGAGTT TAAAAGGTAC 660  
 AATGAGAATC AAGATGAGAT CAGAAAGAGG GTATTTGAGA TGGCTAATTA TGTCAACATG 720  
 CTTTATAAAA AGCTCAATAC TCATGTGGCC TAGTTGGTA TGGAAATCTG GACTGACAAG 780  
 GATAAGATAA AGATAACCCC AAATGCAAGC TTCACCTTGG AGAATTTTTC TAAATGGAGG 840  
 GGGAGTGTTT TCTCAAGAAG AAAGCGTCAT GATATTGCTC AGTTAATCAC AGCAACAGAA 900  
 CTTGTCTGAA CGACTGTGGG TCTTGCAATT 50GTCTACAA TGTGTTCTCC TTATTCTGTT 960

69

70

GGCGTTGTTC AGGACCACAG CGATAATCTT CTTAGAGTTG CAGGGACAAT GGCACATGAA 1020  
 ATGGGCCACA ACTTTGGAAT GTTTCATGAC GACTATTCTT GCAAGTGTCC TTCTACAATA 1080  
 TGTGTGATGG ACAAAGCACT GAGCTTCTAT ATACCCACAG ACTTCAGTTC CTGCAGCCGT 1140  
 CTCAGCTATG ACAAGTTTTT TGAAGATAAA TTATCAAATT GCCTCTTTAA TGCTCCATTG 1200  
 CCTACAGATA TCATATCCAC TCCAATTTGT GGAACCAGT TGGTGGAAAT GGGAGAGGAC 1260  
 TGTGATTGTG GGACATCTGA GGAATGTACC AATATTTGCT GTGATGCTAA GACATGTAAA 1320  
 ATCAAAGCAA CTTTCAATG TGCATTAGGA GAATGTTGTG AAAAATGCCA ATTTAAAAAG 1380  
 GCTGGGATGG TGTGCAGACC AGCAAAAGAT GAGTGCAGCC TGCCTGAAAT GTGTAATGCT 1440  
 AAATCTGGTA ATTGTCCTGA TGATAGATTC CAAGTCAATG GCTTCCCTTG CCATCACGGG 1500  
 AAGGGCCACT GCTTGATGGG GACATGCCCC AACTGCAGG AGCAGTGCAC AGAGCTGTGG 1560  
 GGACCAGGTA GGAGGACAAA TCCTTTCCCC TGTGCATGTG CGAAGGAAAA TCATTTCAGA 1620

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 288

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 4

TTGCCTACAG ATATCATATC CACTCCAATT TGTGGGAACC AGTTGGTGA AATGGGAGAG 60  
 GACTGTGATT GTGGGACATC TGAGGAATGT ACCAATATTT GCTGTGATGC TAAGACATGT 120  
 AAAATCAAAG CAACTTTTCA ATGTGCATTA GGAGAATGTT GTGAAAAATG CCAATTTAAA 180  
 AAGGCTGGGA TGGTGTGCAG ACCAGCAAAA GATGAGTGC ACCTGCCTGA AATGTGTAAT 240  
 GGTAAATCTG GTAATTGTCC TGATGATAGA TTCCAAGTCA ATGGCTTC 288

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 201

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 5

Val Gln Glu His Glu Lys Tyr Ile Glu Tyr Tyr Leu Val Leu Asp Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Glu Phe Lys Arg Tyr Asn Glu Asn Gln Asp Glu Ile Arg Lys Arg  
 20 25 30  
 Val Phe Glu Met Ala Asn Tyr Val Asn Met Leu Tyr Lys Lys Leu Asn  
 35 40 45  
 Thr His Val Ala Leu Val Gly Met Glu Ile Trp Thr Asp Lys Asp Lys  
 50 55 60  
 Ile Lys Ile Thr Pro Asn Ala Ser Phe Thr Leu Glu Asn Phe Ser Lys  
 65 70 75 80  
 Trp Arg Gly Ser Val Leu Ser Arg Arg Lys Arg His Asp Ile Ala Gln  
 85 90 95  
 Leu Ile Thr Ala Thr Glu Leu Ala Gly Thr Thr Val Gly Leu Ala Phe  
 100 105 110  
 Met Ser Thr Met Cys Ser Pro Tyr Ser Val Gly Val Val Gln Asp His  
 115 120 125  
 Ser Asp Asn Leu Leu Arg Val Ala Gly Thr Met Ala His Glu Met Gly  
 130 135 140  
 His Asn Phe Gly Met Phe His Asp Asp Tyr Ser Cys Lys Cys Pro Ser  
 145 150 155 160  
 Thr Ile Cys Val Met Asp Lys Ala Leu Ser Phe Tyr Ile Pro Thr Asp  
 165 170 175  
 Phe Ser Ser Cys Ser Arg Leu Ser Tyr Asp Lys Phe Phe Glu Asp Lys  
 180 190

71  
 Leu Ser Asn Cys Leu Phe Asn Ala Pro  
 195 200 201  
 <210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Human  
 <400> 6  
 Glu Cys Thr Asn Ile Cys Cys Asp Ala Lys  
 1 5 10  
 <210> 7  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223>  
 <400> 7  
 GTRGAISMDK SDGARSARTG TGA  
 <210> 8  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223>  
 <400> 8  
 AYYTGWDBRD DWICDKVDDS IGGGCA  
 <210> 9  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223>  
 <400> 9  
 ATCACAGTCC TCTCCCATTT CCACCAAC  
 <210> 10  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223>  
 <400> 10  
 CACATTTTCAG GCAGGTCGCA CTCATC  
 <210> 11  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223>  
 <400> 11  
 TCGCTGTGGT CCTGAACAAC GCCAACA  
 <210> 12

72

23

26

28

26

27

73

74

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 12

CACACCATCC ATCCACAGG TGCTGTCA

28

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 13

GGAACCAGTT GGTGGAAATG GGAGAGGA

28

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 14

AGGACTGTGA TTGTGGGACG TCTGAGGAA

29

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 775

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 15

Met Leu Gln Gly Leu Leu Pro Val Ser Leu Leu Ser Val Ala Val

1 5 10 15

Ser Ala Ile Lys Glu Leu Pro Gly Val Lys Lys Tyr Glu Val Val Tyr

20 25 30

Pro Ile Arg Leu His Pro Leu His Lys Arg Glu Ala Lys Glu Pro Glu

35 40 45

Gln Gln Glu Gln Phe Glu Thr Glu Leu Lys Tyr Lys Met Thr Ile Asn

50 55 60

Gly Lys Ile Ala Val Leu Tyr Leu Lys Lys Asn Lys Asn Leu Leu Ala

65 70 75 80

Pro Gly Tyr Thr Glu Thr Tyr Tyr Asn Ser Thr Gly Lys Glu Ile Thr

85 90 95

Thr Ser Pro Gln Ile Met Asp Asp Cys Tyr Tyr Gln Gly His Ile Leu

100 105 110

Asn Glu Lys Val Ser Asp Ala Ser Ile Ser Thr Cys Arg Gly Leu Arg

115 120 125

Gly Tyr Phe Ser Gln Gly Asp Gln Arg Tyr Phe Ile Glu Pro Leu Ser

130 135 140

Pro Ile His Arg Asp Gly Gln Glu His Ala Leu Phe Lys Tyr Asn Pro

145 150 155 160

Asp Glu Lys Asn Tyr Asp Ser Thr Cys Gly Met Asp Gly Val Leu Trp

165 50 170 175



75		76
Ala His Asp Leu Gln Gln Asn Ile Ala Leu Pro Ala Thr Lys Leu Val		
180	185	190
Lys Leu Lys Asp Arg Lys Val Gln Glu His Glu Lys Tyr Ile Glu Tyr		
195	200	205
Tyr Leu Val Leu Asp Asn Gly Glu Phe Lys Arg Tyr Asn Glu Asn Gln		
210	215	220
Asp Glu Ile Arg Lys Arg Val Phe Glu Met Ala Asn Tyr Val Asn Met		
225	230	235
Leu Tyr Lys Lys Leu Asn Thr His Val Ala Leu Val Gly Met Glu Ile		
245	250	255
Trp Thr Asp Lys Asp Lys Ile Lys Ile Thr Pro Asn Ala Ser Phe Thr		
260	265	270
Leu Glu Asn Phe Ser Lys Trp Arg Gly Ser Val Leu Ser Arg Arg Lys		
275	280	285
Arg His Asp Ile Ala Gln Leu Ile Thr Ala Thr Glu Leu Ala Gly Thr		
290	295	300
Thr Val Gly Leu Ala Phe Met Ser Thr Met Cys Ser Pro Tyr Ser Val		
305	310	315
Gly Val Val Gln Asp His Ser Asp Asn Leu Leu Arg Val Ala Gly Thr		
325	330	335
Met Ala His Glu Met Gly His Asn Phe Gly Met Phe His Asp Asp Tyr		
340	345	350
Ser Cys Lys Cys Pro Ser Thr Ile Cys Val Met Asp Lys Ala Leu Ser		
355	360	365
Phe Tyr Ile Pro Thr Asp Phe Ser Ser Cys Ser Arg Leu Ser Tyr Asp		
370	375	380
Lys Phe Phe Glu Asp Lys Leu Ser Asn Cys Leu Phe Asn Ala Pro Leu		
385	390	395
Pro Thr Asp Ile Ile Ser Thr Pro Ile Cys Gly Asn Gln Leu Val Glu		
405	410	415
Met Gly Glu Asp Cys Asp Cys Gly Thr Ser Glu Glu Cys Thr Asn Ile		
420	425	430
Cys Cys Asp Ala Lys Thr Cys Lys Ile Lys Ala Thr Phe Gln Cys Ala		
435	440	445
Leu Gly Glu Cys Cys Glu Lys Cys Gln Phe Lys Lys Ala Gly Met Val		
450	455	460
Cys Arg Pro Ala Lys Asp Glu Cys Asp Leu Pro Glu Met Cys Asn Gly		
465	470	475
Lys Ser Gly Asn Cys Pro Asp Asp Arg Phe Gln Val Asn Gly Phe Pro		
485	490	495
Cys His His Gly Lys Gly His Cys Leu Met Gly Thr Cys Pro Thr Leu		
500	505	510
Gln Glu Gln Cys Thr Glu Leu Trp Gly Pro Gly Thr Glu Val Ala Asp		
515	520	525
Lys Ser Cys Tyr Asn Arg Asn Glu Gly Gly Ser Lys Tyr Gly Tyr Cys		
530	535	540
Arg Arg Val Asp Asp Thr Leu Ile Pro Cys Lys Ala Asn Asp Thr Met		
545	550	555
Cys Gly Lys Leu Phe Cys Gln Gly Gly Ser Asp Asn Leu Pro Trp Lys		
565	570	575

77 78  
 Gly Arg Ile Val Thr Phe Leu Thr Cys Lys Thr Phe Asp Pro Glu Asp  
 580 585 590  
 Thr Ser Gln Glu Ile Gly Met Val Ala Asn Gly Thr Lys Cys Gly Asp  
 595 600 605  
 Asn Lys Val Cys Ile Asn Ala Glu Cys Val Asp Ile Glu Lys Ala Tyr  
 610 615 620  
 Lys Ser Thr Asn Cys Ser Ser Lys Cys Lys Gly His Ala Val Cys Asp  
 625 630 635 640  
 His Glu Leu Gln Cys Gln Cys Glu Glu Gly Trp Ile Pro Pro Asp Cys  
 645 650 655  
 Asp Asp Ser Ser Val Val Phe His Phe Ser Ile Val Val Gly Val Leu  
 660 665 670  
 Phe Pro Met Ala Val Ile Phe Val Val Val Ala Met Val Ile Arg His  
 675 680 685  
 Gln Ser Ser Arg Glu Lys Gln Lys Lys Asp Gln Arg Pro Leu Ser Thr  
 690 695 700  
 Thr Gly Thr Arg Pro His Lys Gln Lys Arg Lys Pro Gln Met Val Lys  
 705 710 715 720  
 Ala Val Gln Pro Gln Glu Met Ser Gln Met Lys Pro His Val Tyr Asp  
 725 730 735  
 Leu Pro Val Glu Gly Asn Glu Pro Pro Ala Ser Phe His Lys Asp Thr  
 740 745 750  
 Asn Ala Leu Pro Pro Thr Val Phe Lys Asp Asn Pro Met Ser Thr Pro  
 755 760 765  
 Lys Asp Ser Asn Pro Lys Ala  
 770 775

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 2325

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 16

ATGTTGCAAG GTCTCCTGCC AGTCAGTCTC CTCCTCTCTG TTGCAGTAAG TGCTATAAAA 60  
 GAACTCCCTG GGGTGAAGAA GTATGAAGTG GTTTATCCTA TAAGACTTCA TCCACTGCAT 120  
 AAAAGAGAGG CCAAAGAGCC AGAGCAACAG GAACAATTG AAACTGAATT AAAGTATAAA 180  
 ATGACAATTA ATGGAAAAAT TGCAGTGCTT TATTGAAAA AAAACAAGAA CCTCCTTGCA 240  
 CCAGGCTACA CGGAAACATA TTATAATTCC ACTGGAAAGG AGATCACCAC AAGCCCACAA 300  
 ATTATGGATG ATTGTTATTA TCAAGGACAT ATTCTTAATG AAAAGGTTTC TGACGCTAGC 360  
 ATCAGCACAT GTAGGGTCT AAGGGGCTAC TTCAGTCAGG GGGATCAAAG ATACTTTATT 420  
 GAACCTTTAA GCCCCATACA TCGGGATGGA CAGGAGCATG CACTCTTCAA GTATAACCTT 480  
 GATGAAAAGA ATTATGACAG CACCTGTGGG ATGGATGGTG TGTGTGGGC CCACGATTG 540  
 CAGCAGAACA TTGCCCTACC TGCCACCAAA CTAGTAAAT TGAAAGACAG GAAGGTTTCA 600  
 GAACATGAGA AATACATAGA ATATTATTG GTCCTGGATA ATGGTGAGTT TAAAGGTAC 660  
 AATGAGAATC AAGATGAGAT CAGAAAGAGG GTATTGAGA TGGCTAATTA TGTAACATG 720  
 CTTTATAAAA AGCTCAATAC TCATGTGGCC TTAGTTGGTA TGGAAATCTG GACTGACAAG 780  
 GATAAGATAA AGATAACCCC AAATGCAAGC TTCACCTTGG AGAATTTTC TAAATGGAGG 840  
 GGGAGTGTTT TCTCAAGAAG AAAGCGTCAT GATATTGCTC AGTTAATCAC AGCAACAGAA 900  
 CTGTGCTGAA CGACTGTGGG TCTTGCAATT ATGTCTACAA TGTGTCTCC TTATTCTGTT 960  
 GCGGTTGTTT AGGACCACAG CGATAATCTT CTTAGAGTTG CAGGGACAAT GGCACATGAA 1020  
 ATGGGCCACA ACTTTGGAAT GTTTCATGAC GACTATTCTT GCAAGTGTC TTCTACAATA 1080  
 TGTGTGATGG ACAAAGCACT GAGCTTCTAT 50ACCCACAG ACTTCAGTTC CTGCAGCCGT 1140

79

80

CTCAGCTATG ACAAGTTTTT TGAAGATAAA TTATCAAATT GCCTCTTTAA TGCTCCATTG 1200  
 CCTACAGATA TCATATCCAC TCCAATTTGT GGAACCCAGT TGGTGAAAT GGGAGAGGAC 1260  
 TGTGATTGTG GGACATCTGA GGAATGTACC AATATTGCT GTGATGCTAA GACATGTAAA 1320  
 ATCAAAGCAA CTTTCAATG TGCATTAGGA GAATGTTGTG AAAAATGCCA ATTAAAAAG 1380  
 GCTGGGATGG TGTGCAGACC AGCAAAAGAT GAGTGCAGACC TGCCTGAAAT GTGTAATGGT 1440  
 AAATCTGGTA ATTGCCTGA TGATAGATTC CAAGTCAATG GCTTCCCTTG CCATCACGGG 1500  
 AAGGGCCACT GCTTGATGGG GACATGCCCC ACACTGCAGG AGCAGTGCAC AGAGCTGTGG 1560  
 GGACCAGGAA CTGAGGTTGC AGATAAGTCA TGTACAACA GGAATGAAGG TGGGTCAAAG 1620  
 TACGGGTACT GTCGCAGAGT GGATGACACA CTCATTCCCT GCAAAGCAAA TGATACCATG 1680  
 TGTGGGAAGT TGTTCGTCA AGGTGGGTCG GATAATTGC CCTGGAAAGG ACGGATAGTG 1740  
 ACTTCTCTGA CATGTAAAC ATTTGATCCT GAAGACACAA GTCAGAAAT AGGCATGGTG 1800  
 GCCAATGGAA CTAAGTGTGG CGATAACAAG GTTGCATTA ATGCAGAATG TGTGGATATT 1860  
 GAGAAAGCCT ACAAATCAAC CAATTGCTCA TCTAAGTGCA AAGGACATGC TGTGTGTGAC 1920  
 CATGAGCTCC AGTGTCAATG TGAGGAAGGA TGGATCCCTC CCGACTGCGA TGAATCCTCA 1980  
 GTGGTCTTCC ACTTCTCCAT TGTGGTTGGG GTGCTGTTCC CAATGGCGGT CATTTTGTG 2040  
 GTGGTTGCTA TGGTAATCCG GCACCAGAGC TCCAGAGAAA AGCAGAAGAA AGATCAGAGG 2100  
 CCACTATCTA CCACTGGCAC CAGGCCACAC AAACAGAAGA GGAAACCCCA GATGGTAAAG 2160  
 GCTGTTCAAC CCAAGAGAT GAGTCAGATG AAGCCCCATG TGTATGATCT GCCAGTAGAA 2220  
 GGCAATGAGC CCCAGCCTC TTTTCATAAA GACACAAACG CACTTCCCCC TACTGTTTTT 2280  
 AAGGATAATC CAATGTCTAC ACCTAAGGAC TCAAATCCAA AAGCA 2325

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 17

CATATGGTTC AGGAACATGA GAAATACATA

30

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 18

CTCGAGGAAG CCATTGACTT GGAATCTATC

30

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 19

CTCAGATGTC CCACAATCAC AGTC

24

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

81

82

<400> 20  
ACATGTAAAA TCAAAGCAAC TTTTC 25  
<210> 21  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 21  
GTGGTGGTGG ACAACTAGGA AACTCTGG 28  
<210> 22  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 22  
CGAGGCGAAT CATGGCTCAC CGCG 24  
<210> 23  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 23  
TCCACGCGTT TGGGAAACTT CTTGGCTGCG 30  
<210> 24  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 24  
GCTTCGTCGC CGCTACGCGT GGGGCCGGA 29  
<210> 25  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 25  
ATCGATTGAG CGAGAAGAGC AGACACC 27  
<210> 26  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 26  
AGATCTTGCC ATCCAGATT TCCAGTTT 50 28

83

<210> 27  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223>  
 <400> 27  
 CGCCGCTGGG CTGCCGGGTC  
 <210> 28  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223>  
 <400> 28  
 TCCATCCCGA TGTATGGGGC

20

20

## 【0102】

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のADAMファミリーに属するタンパク質をコードするDNAの塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列を示す（図2に続く）。 20

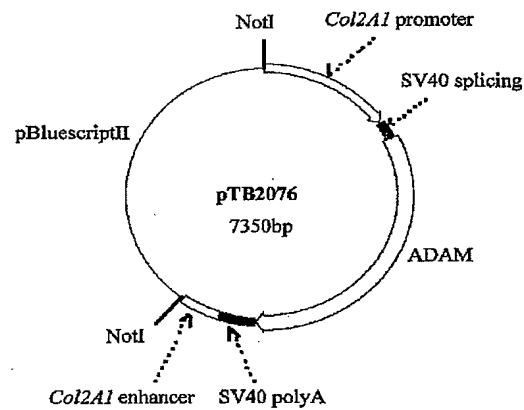
【図2】本発明のADAMファミリーに属するタンパク質をコードするDNAの塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列を示す（図1の続き）。 \*

\*【図3】本発明のADAMファミリーに属するタンパク質をコードするDNAの塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列を示す（図4に続く）。

【図4】本発明のADAMファミリーに属するタンパク質をコードするDNAの塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列を示す（図3の続き）。

【図5】実施例9で作成したベクター（pTB2076）の構築図を示す。

【図5】



[illegible]

[illegible]

[illegible]



[illegible]

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 48/00	
48/00		A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 1/16		9/10	
9/10		13/12	
13/12		19/04	
19/04		19/10	
19/10		29/00	
29/00		43/00	1 1 1
43/00	1 1 1	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18		C 1 2 N 9/14	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/02	C
9/14		C 1 2 Q 1/34	
C 1 2 P 21/02		1/68	Z
C 1 2 Q 1/34		G 0 1 N 33/15	Z
1/68		33/50	Z
G 0 1 N 33/15		33/53	D
33/50		C 1 2 P 21/08	
33/53		A 6 1 K 37/48	
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 N 5/00	B
(C 1 2 N 9/14			
C 1 2 R 1:91)			